

Heda Mara Schmidt

**MAGNITUDE DA RESPOSTA BRONCODILATADORA NA
DPOC: INFLUÊNCIA DO INTERVALO ENTRE AS MEDIDAS
PRÉ E PÓS BRONCODILATADOR, EOSINÓFILOS NO
SANGUE E NO ESCARRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Pizzichini

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schmidt, Heda Mara
MAGNITUDE DA RESPOSTA BRONCODILATADORA NA DPOC:
: INFLUÊNCIA DO INTERVALO ENTRE AS MEDIDAS PRÉ E PÓS
BRONCODILATADOR, EOSINÓFILOS NO SANGUE E NO ESCARRO
/ Heda Mara Schmidt ; orientador, Emilio
Pizzichini, 2017.
57 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novos,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novos. 2. Doença Pulmonar
Obstrutiva Crônica. 3. Resposta Broncodilatadora. 4.
Espirometria. 5. Eosinófilos no Escarro Induzido. I.
Pizzichini, Emilio. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas-Novos. III. Título.


HEDA MARA SCHMIDT

Magnitude da resposta broncodilatadora na DPOC: influência do intervalo entre as medidas pré e pós broncodilatador, eosinófilos no sangue e no escarro

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

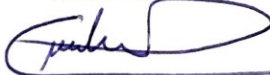
E aprovada em 31 de maio de 2017, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Biomédica**.



Prof. Dr. Getúlio Rodrigues de Oliveira Filho

Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



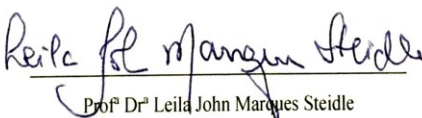
Prof. Dr. Emilio Pizzichini

Presidente/Orientador



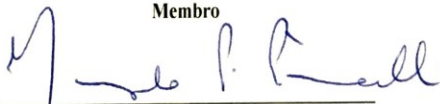
Prof. Dr. José Roberto de Brito Jardim

Membro



Prof.ª Dr.ª Leila John Marques Steidle

Membro



Prof.ª Dr.ª Mariângela Pimentel Pincelli

Membro

Florianópolis, 2017

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Emílio Pizzichini e Márcia Margaret Menezes Pizzichini pela orientação, paciência, e encorajamento em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho. Seu acolhimento foi fundamental, seu espírito científico um exemplo, e agradeço profundamente a oportunidade de aprender e conviver com vocês;

A minha família, em especial meus pais, que sempre me estimularam a buscar o conhecimento e trabalhar com dedicação e amor em todas as esferas da vida;

Ao meu marido Beto e minha filha Ana Beatriz que trazem alegria para minha vida e me apoiam constantemente nos desafios;

A equipe de pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação de Vias Aéreas (NUPAIVA) que participaram da coleta e atendimento aos pacientes desta pesquisa;

Aos amigos de trabalho da Direção do HU/UFSC, com quem aprendo muito e que me apoiam e estimulam diariamente em busca do crescimento pessoal e profissional;

Ao Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas por partilhar seus conhecimentos e estimularem o crescimento científico;

A todos os amigos que com suas atitudes de apoio são os presentes que Deus me dá ao longo da vida.

"A Educação ao Longo da Vida baseia-se em quatro pilares: aprender a conhecer, aprender a fazer, aprender a conviver e aprender a ser."

Jacques Delors

RESUMO

Introdução: O estudo da resposta broncodilatadora e da eosinofilia no escarro ou no sangue de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) estável são de interesse atual em virtude das implicações para o manejo da doença. **Objetivos:** O objetivo primário do presente estudo foi avaliar, em uma amostra de pacientes com DPOC estável, se existem diferenças nas medidas do volume expirado no primeiro segundo (VEF_1) e capacidade vital lenta (CVL) aos 20 e aos 45 minutos após uso de broncodilatador (BD) de curta duração. Adicionalmente foi investigada a presença de correlação entre a magnitude da resposta broncodilatadora e eosinófilos no escarro induzido ou sangue periférico e, avaliada a concordância entre estes dois parâmetros. **Métodos:** Estudo transversal com 37 indivíduos com DPOC moderado a muito grave, integrantes da fase de “run in” de estudo multicêntrico intervencional. Foram realizadas espirometrias antes, 20 e 45 minutos após a inalação de salbutamol 400mcg via espaçador. Sangue periférico para hemograma foi coletado simultaneamente, assim como se induziu e processou o escarro para análise da celularidade. **Resultados:** A maioria dos participantes eram homens (62,2%), com idade média de 67,2 anos. Todos eram fumantes ou ex-fumantes e a carga tabágica média foi de 52,6 maços/ano. Quatorze participantes (37,8%) foram classificados como GOLD II, 13 (35,2%) como GOLD III e dez (27%) como GOLD IV. Nenhum participante fazia uso de corticoide inalatório. A média e intervalo de confiança (IC) 95% da resposta broncodilatadora aos 20 minutos foi de 0,23 L (0,18–0,28) sendo similar à da resposta broncodilatadora aos 45 minutos, de 0,25 L (0,20–0,30), com um coeficiente de correlação intraclassa (CCI) entre as duas medidas de 0,98 (0,97;0,99), $p < 0,001$. Dezesete indivíduos (45,9%) apresentaram resposta broncodilatadora significativa de 200 ml e 12% do valor basal aos 20 minutos. Treze indivíduos (35,1%) tinham eosinofilia no escarro induzido (eosinófilos no escarro $\geq 3\%$), sendo que estes apresentaram limitação ao fluxo de ar das vias aéreas significativamente mais grave do que aqueles com escarro não eosinofílico. A média e IC de 95% da contagem eosinófilos no sangue periférico, expressos em números absolutos $\times 10^9/L$ foi de 0,27(0,21–0,33). A maioria dos participantes (59,5%) tinha uma contagem absoluta de eosinófilos no sangue $\geq 0,2 \times 10^9/L$. Embora houvesse moderada correlação ($r=0,400$; $p=0,01$) entre eosinofilia no escarro e no sangue periférico a concordância entre estes dois parâmetros para diversos pontos de corte, medida pelo *Kappa* estatístico, foi fraca. A resposta

broncodilatadora não se correlacionou com a inflamação eosinofílica em vias aéreas e nem com os eosinófilos no sangue periférico. Conclusões: Estes resultados sugerem que é indiferente medir a resposta broncodilatadora à inalação de 400 mcg de salbutamol aos 20 ou 45 minutos. A magnitude ou presença desta resposta, não está relacionada à inflamação eosinofílica medida no sangue ou no escarro induzido. A concordância entre os eosinófilos no sangue periférico e no escarro induzido foi baixa.

Descritores: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Resposta Broncodilatadora. Espirometria. Eosinófilos no Escarro Induzido. Eosinófilos no Sangue Periférico. Inflamação das Vias Aéreas.

ABSTRACT

Introduction: The study of bronchodilator response and sputum or blood eosinophilia of patients with stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is of current interest due to the implications on the disease management. **Objectives:** The primary objective of this study was to evaluate, in a sample of patients with steroid naive stable COPD, if there were differences in measuring expired volume in the first second (FEV₁) and slow vital capacity (CVL) at 20 and 45 minutes after the use of Bronchodilator (BD). In addition, we investigated the presence of a correlation between the magnitude of the bronchodilator response and induced sputum or peripheral blood eosinophils and agreement between these two parameters. **Methods:** A cross-sectional study with 37 moderate to very severe COPD patients, participants of a multicenter interventional study evaluated in the “run in” phase before any intervention. Spirometry was performed before, 20 and 45 minutes after salbutamol 400mcg inhaled via a spacer. Peripheral blood for cell count was collected simultaneously, as well as sputum induction and processing for cellularity analysis. **Results:** Most of the participants were men (62,2%), with a mean age of 67,2 years. All were smokers or former smokers and the mean smoking load was 52,6 year/pack. Fourteen participants (37,8%) were classified as GOLD II, 13 (35,2%) as GOLD III and ten (27%) as GOLD IV. No one was on inhaled corticosteroids treatment. The mean and 95% confidence intervals (CI) of the 20 minutes bronchodilator response were 0,23 L (0,18-0,28), similar to the 45 minutes bronchodilator response, 0,25 L (0,20-0,30), with an Intra class Correlation Coefficient (ICC) between the two measures of 0,98 (0,97; 0,99), $p < 0,001$. Seventeen individuals (45,9%) had a bronchodilator response of 200 ml and 12% of the baseline value at 20 minutes. Thirteen subjects (35,1%) had induced sputum eosinophilia (sputum eosinophils $\geq 3\%$), and had significantly greater airflow limitation than those with non-eosinophilic sputum. The mean and 95% CI of peripheral blood eosinophil count, expressed in absolute numbers $\times 10^9/L$ was 0,27 (0,21-0,33). Most of participants (59,5%) had an absolute eosinophil count in the blood $\geq 0,2 \times 10^9/L$. Although there was a moderate correlation ($r = 0,400$; $p = 0,01$) between sputum and peripheral blood eosinophils, the agreement between these two parameters at different cutoff points, as measured by statistical Kappa, was poor. The bronchodilator response didn't correlate with airways eosinophilic inflammation nor with peripheral blood eosinophils. **Conclusion:** These results suggest that measuring the bronchodilator

response to the inhalation of 400 mcg of salbutamol at 20 or 45 minutes offers the same information. The magnitude of this response or its presence is not related to the eosinophilic inflammation measured in blood or induced sputum. The agreement between eosinophils in peripheral blood and induced sputum was low.

Keywords: Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Bronchodilator Response. Spirometry. Sputum Eosinophils. Peripheral Blood Eosinophils. Airway Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BD	Broncodilatador
CCI	Coeficiente de Correlação Intraclasse
CCT	Contagem Celular Total
CI	Capacidade Inspiratória
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPT	Capacidade Pulmonar Total
CRQ	<i>Chronic Respiratory Questionnaire</i>
CV	Capacidade Vital
CVF	Capacidade Vital Forçada
CVL	Capacidade Vital Lenta
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECLIPSE	<i>Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints</i>
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
IC	Intervalo de Confiança
ISOLDE	<i>Inhaled Steroids in Obstructive Lung Disease in Europe</i>
NETT	<i>National Emphysema Treatment Trial</i>
NUPAIVA	Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas
PLATINO	<i>Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UPLIFT	<i>Understanding Potential Long-term Impacts on Function with Tiotropium</i>
VEF1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
Δ VEF ₁	Variação do Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos que avaliaram resposta broncodilatadora na DPOC e método empregado.	19
Tabela 2 - Características demográficas e espirométricas dos participantes	31
Tabela 3 - Dados demográficos e funcionais dos indivíduos com e sem resposta broncodilatadora de $\geq 200\text{ml}$ e $\geq 12\%$ do valor pré-broncodilatador.	34
Tabela 4 - Contagem celular total (CCT) e diferencial no escarro induzido.....	35
Tabela 5 - Características dos participantes com (eosinófilos $\geq 3,0\%$) e sem eosinofilia no escarro induzido (eosinófilos $< 3,0\%$).	36
Tabela 6 - Concordância entre escarro eosinofílico e diversos pontos de corte de eosinófilos no sangue periférico	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resposta broncodilatadora ≥ 200 ml no VEF1 medido 20 e 45 minutos após a administração de broncodilatador.....	32
Figura 2 - Concordância entre medidas de VEF1 aos 20 e 45 minutos pós-broncodilatador como proposto por Bland e Altman ⁽⁶⁵⁾	33
Figura 3 - Correlação entre eosinófilos no sangue periférico e no escarro induzido.....	37
Figura 4 - Correlação da variação do VEF1 pós-broncodilatador e eosinófilos no sangue periférico.....	39
Figura 5 - Correlação da variação do VEF1 pós-broncodilatador e eosinófilos no escarro induzido.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios espirométricos para estadiamento da DPOC⁽¹⁾ 28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.2 DIAGNÓSTICO DA DPOC: PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR E RESPOSTA AO BRONCODILATADOR.....	16
1.3 INFLAMAÇÃO NA DPOC.....	19
1.4 JUSTIFICATIVA.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MÉTODOS	25
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	25
3.2 LOCAL DO ESTUDO	25
3.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	25
3.4 TAMANHO DA AMOSTRA	26
3.5 PARTICIPANTES	26
3.5.1 Critérios de inclusão.....	26
3.5.2 Critérios de exclusão	27
3.6 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E DEFINIÇÕES DO ESTUDO ..	27
3.6.1 Espirometria	27
3.6.2 Teste cutâneo	28
3.6.3 Indução, processamento e análise do escarro	28
3.6.4 Contagem de eosinófilos no sangue periférico	30
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 RESPOSTA BRONCODILATADORA.....	31
4.2 CELULARIDADE TOTAL E DIFERENCIAL NO ESCARRO INDUZIDO E CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO SANGUE PERIFÉRICO	35
4.3 CORRELAÇÃO ENTRE EOSINÓFILOS NO ESCARRO E NO SANGUE PERIFÉRICO COM RESPOSTA BRONCODILATADORA	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	54
APÊNDICE	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é de elevada prevalência e atualmente a quarta causa de mortes no mundo, com a projeção de se tornar a terceira causa de mortes em 2020 ⁽¹⁾. Em 2015 a DPOC causou aproximadamente 5% de todas as mortes do mundo e noventa por cento ocorreram em países de baixa e média renda ⁽²⁾. Estima-se que no Brasil menos de um quinto dos pacientes com DPOC tenha diagnóstico estabelecido e, nas fases mais graves da doença, apenas metade receba algum tipo de tratamento específico para sua enfermidade ^(3,4). Considerando que o diagnóstico e tratamento precoces podem influenciar na desaceleração do declínio da função pulmonar, e que nas fases iniciais esta perda seja mais acentuada ^(5,6), é fundamental o esforço para o diagnóstico precoce bem como a instituição de medidas terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas ⁽¹⁾.

Definida como uma enfermidade relacionada à exposição do indivíduo a gases ou partículas nocivas inaladas, trata-se de doença comum, prevenível e tratável ⁽¹⁾. Caracterizada por sintomas respiratórios e limitação persistente ao fluxo de ar nas vias aéreas, que usualmente é progressiva e associada à resposta inflamatória crônica e à alterações estruturais decorrentes em alvéolos e vias aéreas ⁽⁷⁾. A magnitude e predominância dos danos estruturais variam em cada indivíduo, em virtude de características próprias ⁽⁷⁾.

A DPOC produz uma deterioração progressiva da capacidade física e laboral em decorrência de sintomas de dispneia em graus limitantes às diversas atividades da vida cotidiana ^(8,9). Os mecanismos envolvidos na gênese das manifestações clínicas da DPOC são múltiplos, entre os quais se pode ressaltar alterações mecânicas estruturais e inflamatórias locais e sistêmicas cujo resultado é a disfunção do sistema respiratório e de sua interação com os demais sistemas ^(1,7). O aprimoramento do conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na evolução da doença tem permitido o desenvolvimento de novas opções de manejo, com o objetivo de interferir na progressão da limitação ao fluxo de ar ⁽¹⁾. Os fatores que diferenciam a evolução de cada paciente e como estes influenciam o prognóstico, ainda não são completamente claros ⁽⁷⁾.

Do ponto de vista clínico, os sintomas cardinais da DPOC são tosse produtiva e dispneia. Esta última é progressiva e limitante para as atividades físicas. Estes achados relacionam-se à fisiopatologia da

doença, caracterizada de forma geral por obstrução de pequenas vias aéreas com bronquiolite e destruição do parênquima pulmonar com perda das características de recolhimento elástico dos pulmões, caracterizando áreas de enfisema ⁽¹⁰⁻¹²⁾. Ambas as situações têm caráter evolutivo e manifestam-se como uma resposta inflamatória crônica à exposição aos agentes inalantes, em especial, ao tabagismo ^(1,7). As alterações inflamatórias crônicas nos pulmões determinam consequências funcionais importantes incluindo a limitação crônica ao fluxo de ar e a hiperinsuflação pulmonar ^(12,13). Desta forma a DPOC integra conceitos clínicos, inflamatórios e funcionais, o que evidencia a complexa heterogeneidade da doença e sua evolução ^(1,7).

Do ponto de vista de diagnóstico a Estratégia Global para o estudo da DPOC (GOLD), em sua revisão mais recente, sugere a medida da função pulmonar por meio da espirometria para estabelecer o diagnóstico e a classificação de gravidade funcional, relacionando-a ao prognóstico e não mais à classificação da doença, que utiliza agora critérios clínicos predominantemente ⁽¹⁾.

1.2 DIAGNÓSTICO DA DPOC: PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR E RESPOSTA AO BRONCODILATADOR

A avaliação da função pulmonar nos indivíduos portadores de DPOC ainda na atualidade enfrenta desafios em seu método, análise e interpretação ⁽¹⁴⁾. A espirometria, na DPOC, faz parte da avaliação diagnóstica e, até a atualização de 2017 a GOLD ⁽¹⁾ incluía, nos critérios de classificação da doença para planejamento terapêutico, a magnitude da limitação ao fluxo de ar das vias aéreas. A mudança da última atualização da GOLD ⁽¹⁾, em que a espirometria não é mais considerada para classificação da doença e, sim, da gravidade da limitação ao fluxo de ar, foi fundamentada por evidências mais recentes sugerindo que, talvez, a espirometria não tenha aplicabilidade na avaliação evolutiva do paciente e sua resposta às intervenções ^(15,16). Além disso, a variabilidade individual das medidas ao longo do tempo pode limitar o valor de uma única medida em relação ao seu uso como um desfecho clinicamente importante ^(17,18).

A espirometria é um exame de simples execução, com boa reprodutibilidade fornecendo medidas de volumes e fluxos pulmonares através de manobras ventilatórias orientadas ⁽¹⁶⁾. Os parâmetros considerados importantes para diagnóstico e acompanhamento da DPOC permanecem sendo o valor do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) e sua relação com a capacidade vital lenta (CVL) ou

forçada (CVF) ^(1,15,16,19), sendo a relação VEF_1/CVF menor do que 0,7 após broncodilatador o critério para diagnóstico funcional de DPOC ⁽¹⁾. Embora outras provas funcionais (volumes pulmonares e difusão do monóxido de carbono) tenham a vantagem de avaliar de forma mais completa a heterogeneidade e dinâmica das manifestações clínicas dos indivíduos com DPOC, a espirometria oferece a possibilidade de execução em unidades de saúde de menor complexidade, o que permite o diagnóstico precoce e facilita o seguimento dos pacientes ⁽¹⁶⁾.

O uso do valor fixo da razão VEF_1/CVF para o diagnóstico da DPOC vem sendo criticado pelo potencial de identificação errônea da doença nos indivíduos mais jovens e nos mais idosos ^(19,20). Para evitar diagnósticos falso positivos ou falso negativos, alguns autores sugerem o uso dos limites inferiores de normalidade ⁽¹³⁾. Neste sentido, Hansen e col ⁽²¹⁾, estudaram a prevalência de DPOC, usando o banco de dados do estudo NHANES III. Estes autores empregaram ambos os parâmetros da razão VEF_1/CVF : valor fixo e limite inferior da normalidade desta relação. Neste estudo, que incluiu 3497 tabagistas e 5906 adultos saudáveis que nunca fumaram os resultados mostraram que, usando o valor fixo da razão VEF_1/CVF , cerca de metade dos adultos jovens foram erroneamente classificados como tendo espirometria normal, quando a mesma estava claramente alterada pelo limite inferior da normalidade. O contrário aconteceu com um quinto dos indivíduos idosos, cuja espirometria era normal pelo limite inferior da normalidade, mas alterada pelo critério da GOLD ⁽¹⁾.

Além do diagnóstico da limitação ao fluxo de ar na DPOC, a espirometria também permite a avaliação da magnitude da resposta broncodilatadora. A reversibilidade da broncostricção ou resposta broncodilatadora pode ser definida como um aumento do VEF_1 em resposta ao tratamento ativo, que seja superior ao que ocorreria por chance ⁽²²⁾. O coeficiente de variação do VEF_1 em indivíduos normais é menor que 5% com um desvio padrão de medidas, repetidas no mesmo dia, de 102 ml ⁽²³⁾. Isto significa que, se uma alteração no VEF_1 exceder 170 ml pode ser considerada como tendo surgido por outras causas que não por acaso. Tanto a American Thoracic Society (ATS) como as European Respiratory Society (ERS) recomendam que as alterações no VEF_1 somente devam ser consideradas significativas se estas excederem um volume absoluto de 200 ml e 12% em relação ao valor pré-broncodilatador, tanto para VEF_1 quanto para CV ⁽²³⁾.

A medida da resposta broncodilatadora, na prática clínica, deve ser baseada em espirometria realizada de acordo com diretrizes universalmente aceitas. As atuais diretrizes da ATS/ERS ^(19,22)

recomendam que a resposta broncodilatadora seja medida como a seguir: 1) espirometria basal seguida da inalação de 4 jatos de um broncodilatador de ação curta (exemplo salbutamol); 2) espirometria pós-broncodilatador realizada ≥ 10 até 15 minutos se o broncodilatador for salbutamol ou após 30 minutos, se o broncodilatador for um anticolinérgico de ação rápida.

O uso da resposta broncodilatadora na DPOC, como critério para classificação diagnóstica e escolha terapêutica, tem percorrido um longo caminho ⁽²⁴⁻²⁶⁾. Por exemplo, até há pouco tempo, considerava-se que a presença de resposta significativa ao broncodilatador na espirometria excluía o diagnóstico de DPOC ⁽²⁴⁾. Entretanto, estudos mais recentes evidenciam que a resposta broncodilatadora significativa pode estar presente em pacientes com DPOC e que esta pode variar ao longo do tempo, em um mesmo indivíduo ⁽¹⁸⁾.

A prevalência de resposta broncodilatadora significativa em pacientes com DPOC varia de 9% ⁽²⁷⁾ a 52% ⁽¹⁵⁾. Parte desta variabilidade pode ser explicada por diferenças metodológicas, facilmente observadas pela heterogeneidade entre os diversos estudos no que se refere a esta medida ⁽²⁸⁾. Entre os diversos fatores que podem influenciar a resposta ao broncodilatador se encontram o tipo de broncodilatador utilizado, a dose, o tempo da medida após inalação e a própria variabilidade individual nas medidas ao longo do tempo ^(15,28). Apesar das recomendações atuais das diretrizes para avaliar a resposta broncodilatadora ^(19,22), o intervalo de tempo utilizado para medida de VEF₁ após inalação do broncodilatador varia de 15 minutos até uma hora nas diversas publicações ^(18,28-35) (Tabela 1).

Tabela 1 - Estudos que avaliaram resposta broncodilatadora na DPOC e método empregado.

Estudo	Número de pacientes	Broncodilatador e dose utilizados	Tempo para medida pós broncodilatador
ECLIPSE ⁽¹⁸⁾	1831	Salbutamol 400 µg	15min
ISOLDE ⁽²⁸⁾	660	Salbutamol 400 µg e 80 µg ipratropio	30min + 30 min
UPLIFT ⁽²⁹⁾	5756	Ipratropio 80 µg e salbutamol 200 µg	60min+30 min
PLATINO ⁽³⁵⁾	5571	Salbutamol 200 µg	15min
NETT ⁽³²⁾	544	Salbutamol 116 µg	15min

ECLIPSE: *Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints*; ISOLDE: *Inhaled Steroids in Obstructive Lung Disease in Europe*; UPLIFT: *Understanding Potential Long-term Impacts on Function with Tiotropium*; PLATINO: *Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar*; NETT: *National Emphysema Treatment Trial*

O salbutamol inalatório na dose de 200 a 400mcg é o broncodilatador mais comumente usado e, mais frequentemente, é utilizado um intervalo de 15 minutos entre inalação do broncodilatador e medida do VEF₁ pós, uma vez que este é considerado o tempo mínimo para o efeito farmacológico desta droga^(23,35). Entretanto, se desconhece se há vantagens em medir a resposta broncodilatadora mais tardiamente. Contudo, é plausível imaginar que, ao ampliarmos o intervalo de tempo para medida do VEF₁ após broncodilatador possa haver um incremento de reversibilidade em um grupo de pacientes com DPOC⁽³⁵⁾.

1.3 INFLAMAÇÃO NA DPOC

A presença de inflamação na DPOC, estabelecida como resposta à inalação de partículas e gases tóxicos, é associada aos achados patológicos da doença^(36,37), e entendida como resposta local e sistêmica persistente⁽³⁷⁻³⁹⁾. A inclusão da presença de inflamação nos critérios de acompanhamento da doença é defendida mesmo nas situações de doença estável^(37,38).

Alguns estudos, embora não conclusivos, sugerem que o aumento das células inflamatórias nas vias aéreas está relacionado à gravidade da doença e ao declínio da função pulmonar, assim como a

inflamação sistêmica pode estar associada às comorbidades e ao risco de exacerbações^(38,40).

A inflamação das vias aéreas na DPOC é caracteristicamente neutrofílica. Entretanto, dados de um grande estudo longitudinal (ECLIPSE - *Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points*) não estabeleceu relação deste achado e sua variação com desfechos clínicos significativos⁽⁴¹⁾. Outros autores citam a predominância de inflamação neutrofílica em indivíduos com perfil de maior gravidade da DPOC, sugerindo haver relação com a presença de enfisema⁽⁴²⁾.

Além da inflamação neutrofílica, a presença de inflamação eosinofílica nas vias aéreas de pacientes com de DPOC pode ser identificada em 10 a 40% dos casos em diversos estudos⁽⁴³⁾. O impacto deste achado vem sendo estudado com focos diversos, relacionados à resposta broncodilatadora, e à frequência de exacerbações⁽⁴⁴⁾. A presença de inflamação eosinofílica nas vias aéreas de pacientes com DPOC está relacionada à responsividade aos corticoides⁽⁴⁵⁾ e por este motivo, é considerada relevante no manejo da DPOC. Além disso, a investigação da relação entre padrão inflamatório, declínio funcional e exacerbações pode auxiliar no estabelecimento de propostas terapêuticas individualizadas, especialmente se considerarmos a heterogeneidade da DPOC em suas manifestações clínicas, evolução e prognóstico^(13,37,43,46-47).

Neste sentido, a análise do escarro induzido é uma ferramenta amplamente aceita e validada para o estudo das células inflamatórias nas vias aéreas, sendo considerada minimamente invasiva, segura e reprodutível^(43,48-50). Embora válida para avaliar a inflamação das vias aéreas, a análise da celularidade do escarro induzido requer qualificação técnica, o que torna sua aplicabilidade na prática clínica infrequente. Por este motivo, têm sido investigados outros biomarcadores que se relacionem à presença e ao tipo de inflamação das vias aéreas. Consequentemente, pesquisas recentes têm avaliado a utilidade da medida de eosinófilos no sangue periférico como um marcador da inflamação eosinofílica nas vias aéreas de portadores de DPOC⁽⁵¹⁻⁵³⁾. Em revisão dos dados coletados no estudo ECLIPSE (*Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points*), Singh e col⁽⁵²⁾ observaram que houve concordância nos pontos de corte para medida de eosinófilos no sangue (de 2% do total de leucócitos ou valor absoluto de 150 células/ μ L), sendo 2% relatado como valor de alta sensibilidade para presença de eosinofilia no escarro. Estes autores identificaram que cerca de 37% dos portadores de DPOC apresentaram

medida de eosinófilos sanguínea acima de 2% e observaram que a resposta ao tratamento com corticoides foi associada à presença deste achado.

Na publicação recente das diretrizes GOLD ⁽¹⁾ a medida de eosinófilos sanguínea é citada como um biomarcador do risco de exacerbações, com a ressalva de que ainda são necessários estudos para a definição do melhor ponto de corte para uso clínico e avaliação de impacto terapêutico.

Recentemente, Negewo e col ⁽⁵³⁾ demonstraram que existe correlação entre eosinofilia no escarro induzido e medidas de eosinófilos no sangue periférico e que o ponto de corte $\geq 0,3 \times 10^9/L$ (especificidade = 76%, sensibilidade = 60%) permitiu a identificação de eosinofilia no escarro induzido em 71% dos casos. Já o ponto de corte $\geq 0,4 \times 10^9/L$ apresentou habilidade similar em prever eosinofilia no escarro, porém com melhor especificidade (91,7%). Os autores concluem que a medida de eosinófilos no sangue pode ser usada com razoável grau de acurácia para identificar a eosinofilia das vias aéreas na DPOC.

1.4 JUSTIFICATIVA

A DPOC é uma doença das vias aéreas sendo o declínio progressivo da função pulmonar e a ocorrência de exacerbações os principais determinantes da morbimortalidade desta doença ^(54,55). Central na gênese destes desfechos é a presença de uma reação inflamatória a agentes nocivos inalatórios ⁽¹⁾. Mais recentemente, esta resposta inflamatória tem sido considerada heterogênea e utilizada para caracterizar os fenótipos inflamatórios eosinofílico ou não eosinofílico ⁽⁴⁴⁾. A importância destes fenótipos vem sendo investigada.

Por outro lado, a antiga percepção de que a obstrução ao fluxo de ar fosse irreversível, tem sido questionada. Nesse sentido, as atuais diretrizes reconhecem que a limitação ao fluxo de ar na DPOC é parcial ⁽¹⁾ e que a resposta broncodilatadora possa ser variável ao uso de broncodiladores inalatórios ⁽³⁵⁾. Esta caracterização adiciona mais um componente à heterogeneidade da doença. Sua relevância, à semelhança do processo inflamatório, continua sendo investigada. Além disso, tem sido postulado que o intervalo de tempo entre a inalação do broncodilatador e a medida da resposta broncodilatadora, possam influenciar a magnitude dessa resposta ⁽²⁹⁾. Teoricamente, a medida dos fluxos e volumes pulmonares após um intervalo de tempo maior, resultaria em maior proporção de portadores de DPOC classificados

como responsivos ⁽³⁵⁾. Até o presente, poucos estudos investigaram esta possibilidade.

Outro aspecto fundamental do manejo da DPOC é a escolha do tratamento farmacológico. Primariamente, as intervenções farmacológicas na DPOC estão direcionadas ao controle das limitações atuais decorrentes dos sintomas e à prevenção da progressão da doença, resultante majoritariamente, da ocorrência das exacerbações. O manejo farmacológico da DPOC inclui primariamente a broncodilatação para a redução dos sintomas e o emprego de intervenções capazes de reduzir a ocorrência de exacerbações nos pacientes em que estas são frequentes. A escolha do tratamento, idealmente, deve ser individualizada de acordo com a gravidade da obstrução das vias aéreas, intensidade dos sintomas, fatores de risco para exacerbações, fenótipo e, provavelmente, outros ^(45,55). Entretanto, considerando a heterogeneidade da doença e a necessidade de individualizar o tratamento de acordo com as características dos pacientes, a pesquisa de fatores inflamatórios e funcionais que possam agrupar pacientes em fenótipos específicos ou grupos clínicos, é um foco importante que vem sendo ressaltado em pesquisas recentes sobre o tratamento da DPOC ^(32,37,52).

Com relação aos fenótipos, diversos autores têm avaliado a relação de biomarcadores com padrões e desfechos clínicos ^(13,56-58). Neste sentido, a presença de eosinófilos no sangue periférico vem sendo utilizada como um biomarcador da inflamação eosinofílica das vias aéreas (bronquite eosinofílica) ⁽⁵⁹⁾. Além disto, alguns autores sugerem que, a resposta broncodilatadora na DPOC, possa ser um marcador indireto da presença de bronquite eosinofílica ⁽⁶⁰⁾. Embora reconhecida parcialmente na versão mais recente do GOLD ⁽¹⁾, ambas as situações, ainda são motivo de debate e não estão esclarecidas.

Neste sentido, o presente estudo se propõe a avaliar a importância da medida do VEF₁ em diferentes intervalos de tempo após uso de broncodilatador em indivíduos portadores de DPOC virgens de tratamento antiinflamatório e em fase estável da doença. Adicionalmente avaliaremos a caracterização da inflamação eosinofílica nas vias aéreas e no sangue periférico neste grupo de indivíduos bem como a correlação entre os mesmos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

1. Avaliar se existem diferenças nas medidas do VEF₁ e CVL aos 20 minutos e 45 minutos após uso do broncodilatador de curta duração em pacientes estáveis com DPOC, virgens de uso de corticoides inalatórios.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se existe correlação entre a magnitude da resposta broncodilatadora e eosinófilos no escarro induzido ou no sangue periférico nos participantes deste estudo.
2. Avaliar a concordância entre eosinofilia das vias aéreas e diferentes pontos de corte dos eosinófilos no sangue periférico nos participantes deste estudo.

3 MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo multicêntrico transversal. Os dados de 37 indivíduos portadores de DPOC, que haviam sido consecutivamente recrutados para um estudo multicêntrico intervencional cujo objetivo secundário era determinar a relevância do intervalo de tempo na resposta broncodilatadora, foram obtidos na segunda visita do período de “*run in*”.

Na visita referente aos dados analisados, os participantes do estudo foram submetidos, sequencialmente, a coleta de amostra de sangue periférico, espirometria pré-broncodilatador, inalação de salbutamol 400mcg administrado via espaçador volumétrico, medida do VEF₁ 20 e 45 minutos após a administração do broncodilatador e indução de escarro. Todos os participantes foram orientados a suspender o uso de broncodilatadores por um período mínimo de 6 horas previamente à realização dos exames.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

Três centros participaram do estudo: Firestone Regional Chest & Allergy Unit, St Joseph's Hospital, Hamilton, Canada, NUPAIVA (Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas) do Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil e, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pacientes que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em projeto que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o parecer n 208/98 e pelos demais comitês dos respectivos centros participantes. Os dados coletados encontram-se armazenados conforme as orientações relativas à guarda de documentos de pesquisa no Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas (NUPAIVA), responsável por manter a guarda e confidencialidade dos indivíduos.

3.4 TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado estimando um coeficiente de correlação intraclasse de 0,6, com α (dois lados) = 5% e β de 20% (poder de 80%). Para estes parâmetros, a amostra mínima estimada foi de 19 participantes. Entretanto, considerando que eosinofilia no escarro seria um dos parâmetros utilizados e que a ocorrência desta é de cerca 30% ^(44,51,61) em portadores de DPOC e considerando possíveis perdas aumentamos o número da amostra para 40.

3.5 PARTICIPANTES

A população alvo deste estudo foi composta por pacientes estáveis, com DPOC relacionada ao tabagismo, moderado à grave e que foram atendidos em ambulatório especializado em doenças respiratórias. Os indivíduos que consentissem em participar do estudo e que preenchessem os critérios de inclusão, após assinarem o consentimento informado, foram consecutivamente incluídos no estudo.

3.5.1 Critérios de inclusão

1. Idade > 40 anos
2. Fumantes ou ex-fumantes com história de tabagismo > 20 anos/maço.
3. Diagnóstico clínico de DPOC confirmado pela presença de obstrução ao fluxo de ar das vias aéreas conforme demonstrado pela razão VEF₁/CVF pós-broncodilatador < 0,7.
4. Ausência do uso prévio de esteroides ou não ter usado corticosteroides oral ou inalatório nas últimas 6 semanas.
5. Sem história de infecção aguda definida como: i) ou desenvolvimento de uma infecção respiratória concomitante com ou sem escarro purulento, ou ii) a adição de qualquer medicamento (incluindo antibióticos ou corticosteroides inalatórios ou orais), ou iii) hospitalização durante as últimas 6 semanas.
6. Medicação inalterada no último mês.
7. Sem outra doença respiratória concomitante.
8. Capaz de produzir um volume adequado de escarro não purulento para permitir a contagem total e diferencial das células.
9. Capaz de completar adequadamente, como indicado no protocolo, os testes de função pulmonar.

10. Pacientes que assinaram o consentimento livre e informado para participar no estudo.

3.5.2 Critérios de exclusão

1. Coexistência de outra doença grave ou não controlada, que na opinião dos investigadores possa ser agravada pelo estudo.
2. Pacientes que por qualquer razão são incapazes de realizar de maneira adequada a provas de função pulmonar.
3. História prévia de asma.

3.6 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E DEFINIÇÕES DO ESTUDO

Os participantes elegíveis para o estudo foram submetidos aos procedimentos descritos abaixo em visita única, após coleta de dados demográficos, clínicos e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.6.1 Espirometria

A espirometria foi realizada utilizando-se um espirômetro computadorizado (Koko Spirometer, PDS Instrumentation, Louisville, USA) nos padrões de procedimentos estabelecidos pelos Consensos da American Toracic Society (ATS), European Respiratory Society (ERS)⁽¹⁹⁾ e Global Initiative for COPD (GOLD)⁽¹⁾. Os pacientes foram orientados a suspender o uso de broncodilatadores conforme recomendações e padrões ATS/ERS. Foram realizadas três medidas que preenchessem critérios de reprodutibilidade e aceitabilidade de curvas com medida do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁), e capacidade vital lenta (CVL), pré-broncodilatador, 20 minutos e 45 minutos após a inalação de 400mcg de salbutamol por dosímetro com aerocâmara de 750ml (Ventichamber). Os exames foram realizados por pessoal técnico especializado. Os valores previstos da normalidade foram os publicados por Crapo et al⁽⁶²⁾.

A reversibilidade ao broncodilatador foi definida segundo os critérios ATS/ERS⁽²³⁾ sendo igual ou maior a 0,2L e 12% em relação ao valor da medida basal pré-broncodilatador para VEF₁ e capacidade vital (CV). A classificação da gravidade da limitação ao fluxo de ar das vias aéreas foi feita de acordo com os critérios da GOLD⁽¹⁾ conforme discriminado no Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios espirométricos para estadiamento da DPOC⁽¹⁾

Estádio I - DPOC leve	$VEF_1/CVF < 0,7$ e $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto
Estádio II - DPOC moderada	$VEF_1/CVF < 0,7$ e $VEF_1 < 80\%$ e $\geq 50\%$ do previsto
Estádio III - DPOC grave	$VEF_1/CVF < 0,7$ e $VEF_1 < 50\%$ e $\geq 30\%$ do previsto
Estádio IV- DPOC muito grave	$VEF_1/CVF < 0,7$ e $VEF_1 < 30\%$ do previsto

DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica VEF_1 = Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo CVF = Capacidade Vital Forçada VEF_1/CVF = Relação VEF_1/CVF após uso de broncodilatador.

3.6.2 Teste cutâneo

Teste cutâneo de alergia foi realizado pela técnica de punctura modificada ⁽⁶³⁾ usando 14 extratos alergênicos inalatórios comuns. A leitura foi feita após 15 minutos, registrando-se o diâmetro médio da circunferência em milímetros. Atopia foi definida pela presença de um ou mais testes cutâneos com um diâmetro de enduração 3 mm maior do que o resultado do controle negativo.

3.6.3 Indução, processamento e análise do escarro

O escarro foi induzido de acordo com o método descrito por Pizzichini e col ⁽⁴⁹⁾. Em síntese, o procedimento foi iniciado 15 minutos após a administração de 200 µg de salbutamol inalatório. A indução do escarro foi realizada por meio da inalação de um aerossol de solução salina isotônica (0,9%) seguida por inalação de um aerossol de solução salina em concentrações crescentes de 3%, 4% e 5%, cada uma destas inalada por 7 minutos sucessivamente até a última concentração ou até uma queda do volume expirado no primeiro segundo (VEF_1) igual ou superior a 20% em relação ao valor basal, sendo, neste caso, interrompida a indução. Para a nebulização da solução salina foi utilizado um nebulizador ultrassônico Fisoneb (Fisons, Pickering, Ontario, Canadá). Os pacientes foram orientados a enxaguar a boca, engolir a água e assoar o nariz para minimizar a contaminação com saliva ou descarga pós-nasal após cada inalação. A seguir, foram instruídos a tossir e depositar o escarro em um recipiente limpo. Esses procedimentos foram repetidos a cada inalação, quando também foi

medido o VEF₁ visando garantir a segurança do teste, sendo que a concentração da solução salina da inalação seguinte não foi aumentada caso ocorresse uma queda do VEF₁ $\geq 10\%$ em relação ao valor basal.

O processamento do escarro foi realizado dentro de duas horas de acordo com a técnica descrita por Pizzichini e col⁽⁴⁹⁾. Inicialmente, as porções densas do material expectorado foram selecionadas a olho nu ou, se necessário, sob visualização de um microscópio invertido, usando-se um fórceps de 115 μm para separar o escarro da saliva. A fração selecionada foi colocada em um tubo de poliestireno de 15 ml e tratada com quatro vezes o seu volume de ditioneitol (DTT) a 0,1% (Sputalysin 10%; Calbiochem Corp., San Diego, CA). O tubo de poliestireno foi então colocado em um agitador de mesa (Dade Tube Rocker; Baxter Diagnostics Corporation, Miami, EUA) e agitado por 15 minutos. Para sustar o efeito do DTT sobre a suspensão de células, foi adicionada solução salina tamponada em fosfato de Dulbecco (D-PBS) em quantidade correspondente a quatro vezes o volume inicial de escarro selecionado. A suspensão resultante foi filtrada em um filtro de náilon com microporos de 48 μm (BBS Thompson, Scarborough, Ontario) para remover os restos celulares e o muco não dissolvido. Em seguida, foi realizada a contagem celular total de leucócitos, excluindo-se as células escamosas, utilizando-se um hemocítômetro de Neubauer modificado. A viabilidade celular foi determinada por meio do método de exclusão pelo trypan blue (as células mortas aparecem em azul). Sessenta a oitenta microlitros da suspensão, ajustada para $1,0 \times 10^6/\text{ml}$, foram colocados em recipientes para uma citocentrífuga Shandon III (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) e quatro citospinas codificadas foram preparadas a 450 rpm por 6 minutos. Depois de secar ao ar livre, as citospinas foram coradas pelo corante de Giemsa para a contagem diferencial de células, sendo que 400 células não escamosas foram contadas na lâmina de melhor qualidade.

As contagens celulares foram relatadas em números absolutos e expressas em percentuais. Eosinofilia no escarro caracterizando inflamação eosinofílica foi considerada presente se a proporção de eosinófilos fosse $\geq 3\%$ e inflamação neutrofílica presente se a proporção de neutrófilos fosse $\geq 64\%$ ⁽⁶⁴⁾.

3.6.4 Contagem de eosinófilos no sangue periférico

Sangue periférico para contagem de eosinófilos foi coletado antes da espirometria, em amostra de 20ml, com realização de hemograma e contagem diferencial de células do sangue periférico de acordo com métodos padronizados universalmente. Os resultados foram expressos em número de células por microlitro de sangue e percentual do total de leucócitos.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados de distribuição normal estão resumidos em forma de média e intervalo de confiança (IC) de 95%. Variáveis categóricas estão apresentadas como percentuais. A concordância entre as repostas broncodilatadoras aos 20 e 45 minutos foi avaliada pela concordância por meio do coeficiente de correlação intraclasse (CCI) e graficamente apresentado de acordo com Bland-Altman ⁽⁶⁵⁾. A interpretação do CCI foi baseada na classificação proposta por Landis e Koch ⁽⁶⁶⁾ onde um CCI de 0 a 0,20 indica “concordância fraca”, de 0,21 a 0,4 “concordância aceitável”, de 0,41 a 0,60 “concordância moderada”, de 0,61 a 0,8 “concordância substancial, e >0,81 “concordância quase perfeita”. A concordância entre escarro eosinofílico e diferentes pontos de corte para eosinófilos no sangue periférico foi calculada por meio do *Kappa* e a interpretação dos resultados foi baseada nos pontos de corte propostos por Landis e Koch ⁽⁶⁶⁾ como descrito acima. Correlações entre variáveis foram estimadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Diferenças entre a resposta broncodilatadora aos 20 e 45 minutos foi examinada pelo teste t pareado. Diferenças entre grupos foi avaliada pelo teste t de student. Todos os testes estatísticos foram bi caudados e o nível de significância aceito foi de 5%.

Todas as análises foram feitas usando o pacote estatístico SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences* for Windows, versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Il, EUA).

4 RESULTADOS

As características demográficas dos indivíduos estão descritas na Tabela 2. A maioria dos participantes era do gênero masculino (62,2%), com idade média de 67,2 anos. Apenas 37,8% eram fumantes ativos, e a carga tabágica média foi de 52,6 maços/ano. Quatorze participantes (37,8%) foram classificados como classe funcional GOLD II, 13 (35,2%) como GOLD III e 10 (27%) como GOLD IV.

Tabela 2 - Características demográficas e espirométricas dos participantes

Características	n=37
Idade, anos	67,2 (64,3 – 70,1)
Gênero masculino, n (%)	23 (62,2)
Tabagismo ativo, n (%)	14 (37,8)
Carga tabágica, maços/ano	52,6 (43,9 – 61,3)
Atopia, n (%)*	7 (18,9)
Função pulmonar	
VEF ₁ pré-BD, % do previsto	42,2 (37,5 – 47,0)
CVL pré-BD, % do previsto	77,7 (72,4 – 83,1)
VEF ₁ /CV pós-BD	0,42 (0,38 – 0,45)
Gravidade da limitação ao fluxo de ar**	
GOLD II, n (%)	14 (37,8)
GOLD III, n (%)	13 (35,2)
GOLD IV, n (%)	10 (27,0)

Variáveis categóricas estão expressas como valor absoluto e percentuais. Variáveis contínuas expressas como médias, e intervalo de confiança de 95%.

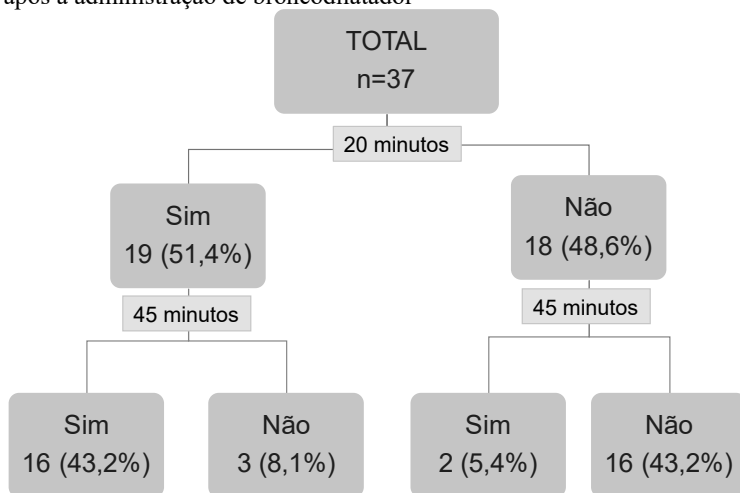
*Atopia significa um ou mais testes de alergia cutânea (por punctura) positivo, com um halo 3 mm maior do que o controle negativo. ** Ref ⁽¹⁾ VEF₁ = Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo BD = broncodilatador CVL = Capacidade Vital Lenta VEF₁/CV = Relação VEF₁/CV após uso de broncodilatador. GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

4.1 RESPOSTA BRONCODILATADORA

Dezesseis indivíduos (43,2%) apresentaram resposta broncodilatadora ≥ 200 ml tanto aos 20 quanto aos 45 minutos pós-broncodilatador. Outros 16 indivíduos (43,2%) não apresentaram resposta broncodilatadora em ambas as mensurações (20 e 45 minutos). Três indivíduos (8,1%) tiveram resposta broncodilatadora ≥ 200 ml apenas na mensuração aos 20 minutos e dois indivíduos (5,4%)

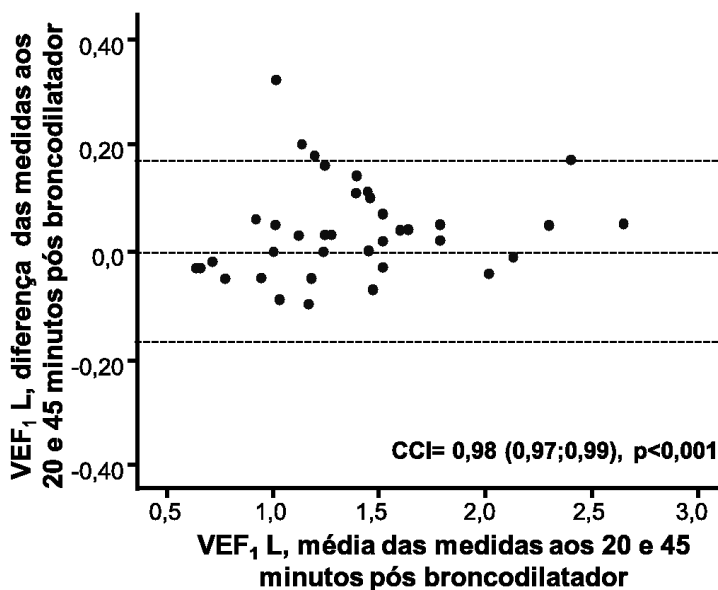
apresentaram esta resposta apenas na mensuração aos 45 minutos pós-broncodilatador (Figura 1). Dezesete indivíduos (45,9%) apresentaram resposta broncodilatadora com aumento do $VEF_1 \geq 200\text{ml}$ e $\geq 12\%$ do valor basal na medida 20 minutos pós-broncodilatador.

Figura 1 - Resposta broncodilatadora $\geq 200\text{ml}$ no VEF_1 medido 20 e 45 minutos após a administração de broncodilatador



A média e IC 95% da resposta broncodilatadora, medida pela variabilidade do VEF_1 aos 20 minutos [0,23 L (0,18–0,28)] foi similar ($p=0,08$) à da resposta broncodilatadora aos 45 minutos que foi de 0,25 L (0,20–0,30), com um CCI entre as duas medidas de 0,98 (0,97; 0,99), $p<0,001$ (Figura 2). Da mesma forma, a média e IC 95% da resposta broncodilatadora, medida pela variabilidade do CVL aos 20 minutos [0,41 L (0,26–0,55)] também foi similar ($p=0,07$) à da resposta broncodilatadora aos 45 minutos [0,49 L (0,33–0,63)], com um CCI entre as duas medidas de 0,89 (0,79; 0,94), $p<0,001$.

Figura 2 - Concordância entre medidas de VEF₁ aos 20 e 45 minutos pós-broncodilatador como proposto por Bland e Altman ⁽⁶⁵⁾



As plotagens se referem às diferenças entre as medidas do VEF₁ aos 20 e 45 minutos (eixo Y) em relação a média das duas medidas (eixo X). A linha central indica média das diferenças, e as linhas periféricas, os limites superior e inferior de concordância. CCI = coeficiente de correlação intraclasse.

A Tabela 3, mostra que indivíduos com e sem resposta broncodilatadora aos 20 minutos não diferiram em suas características clínicas.

Tabela 3 - Dados demográficos e funcionais dos indivíduos com e sem resposta broncodilatadora de ≥ 200 ml e $\geq 12\%$ do valor pré-broncodilatador.

Resposta Broncodilatadora	Sim (n=17)	Não (n=20)	p
Idade, anos	65,6 (60,4 – 70,8)	68,5 (65,2 – 71,9)	0,3
Gênero masculino, n (%)	10 (58,8)	13 (65,0)	0,7
Carga tabágica, maços/ano	47,1 (38,4 – 55,8)	57,3 (42,5 – 70,0)	0,2
Atopia, n (%) *	1 (5,9)	6 (30,0)	0,09
VEF ₁ pré-BD, % do previsto	42,2 (36,1 – 48,4)	42,2 (34,5 – 49,9)	0,9
CVL pré-BD, % do previsto	77,4 (69,3 – 85,4)	78,0 (70,2 – 85,9)	0,9
VEF ₁ /CVL pós-BD	0,42 (0,36 – 0,47)	0,41 (0,35 – 0,47)	0,9
<u>Gravidade da limitação ao fluxo de ar**</u>			
GOLD II, n (%)	5 (29,4)	9 (45,0)	0,7
GOLD III- GOLD IV, n (%)	12 (70,6)	11 (55,0)	

Variáveis categóricas estão expressas como valor absoluto e percentuais. Variáveis contínuas expressas como médias, e intervalo de confiança de 95%.

*Atopia significa um ou mais testes de alergia cutânea (por punctura) positivo, com um halo 3 mm maior do que o controle negativo. ** Ref ⁽¹⁾ VEF₁ = Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo BD = broncodilatador CVL = Capacidade Vital Lenta VEF₁/CVL = Relação VEF₁/CVL após uso de broncodilatador. GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

4.2 CELULARIDADE TOTAL E DIFERENCIAL NO ESCARRO INDUZIDO E CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO SANGUE PERIFÉRICO

A Tabela 4 mostra as características inflamatórias celulares no escarro induzido dos participantes do estudo. Como esperado, o perfil inflamatório dos portadores de DPOC foi caracterizado por um aumento significativo na contagem celular total e neutrofilia, embora 35,1 % destes indivíduos também apresentassem inflamação eosinofílica.

Tabela 4 - Contagem celular total (CCT) e diferencial no escarro induzido.

Celularidade	Mediana (10 – 90 percentis)
CCT x 10 ⁶ / mg	6,9 (2,3 – 29,1)
Neutrófilos %	70,4 (46,6 – 90,7)
Eosinófilos %	1,3 (0 – 7,2)
Macrófagos %	26,4 (7,0 – 51,0)
Linfócitos %	0,3 (0 – 2,7)
Eosinofilia n (%)*	13 (35,1)

CCT- contagem total de células. * eosinofilia= eosinófilos \geq 3,0%

Indivíduos com eosinofilia no escarro induzido foram similares aqueles sem eosinofilia no que diz respeito à idade, gênero, tabagismo em maços/ano, presença de atopia e medida de eosinófilos no sangue periférico (Tabela 5). No entanto, participantes com escarro eosinofílico apresentaram limitação ao fluxo de ar das vias aéreas significativamente mais grave do que aqueles com escarro não eosinofílico, conforme indicado pelo VEF₁% do previsto e pela relação VEF₁/CVL pós-broncodilatador. Em paralelo a estes achados, no grupo de pacientes com escarro eosinofílico houve predominância dos estádios a GOLD III a IV. Contudo, não houve diferença na resposta broncodilatadora, tanto expressa em L quanto expressa em percentual do previsto.

Tabela 5 - Características dos participantes com (eosinófilos $\geq 3,0\%$) e sem eosinofilia no escarro induzido (eosinófilos $< 3,0\%$).

Características	Eosinófilos ≥3,0% (n=13)	Eosinófilos <3,0% (n=24)	p
Idade, anos	68,7 (64,7– 72,6)	66,4 (62,3 –70,3)	0,4
Gênero masculino, n (%)	11 (84,6)	12 (50,0)	0,04
Carga tabágica, maços/ano	58,0 (40,3 – 75,7)	49,7 (39,4 – 59,9)	0,4
Atopia, n (%) *	2 (15,4)	5 (20,8)	0,9
VEF ₁ pré-BD, % do previsto	33,0 (25,0 – 40,3)	47,2 (41,7– 52,7)	0,003
CVL pré-BD, % do previsto	78,0 (66,6 – 89,4)	77,6 (71,4 – 83,7)	0,07
VFE ₁ /CVL pós-BD	0,36 (0,30 – 0,42)	0,48 (0,45 – 0,52)	0,001
Δ VEF ₁ pós-BD 20 min, L**	0,21 (0,13 – 0,28)	0,23 (0,16 – 0,30)	0,7
Δ VEF ₁ pós-BD 20 min, %***	20,0 (11,7 – 28,5)	19,4 (14,6 – 24,1)	0,8
<u>Gravidade da limitação ao fluxo de ar****</u>			
GOLD II, n (%)	3 (23,0)	11 (45,8)	0,08
GOLD III–GOLD IV, n (%)	10 (77,0)	13 (54,2)	
<u>Eosinófilos no sangue periférico</u>			
≥0,2x10 ⁹ /L, n (%)	9 (69,2)	13 (54,2)	0,4
≥ 2%, n (%)	11 (84,6)	17 (70,8)	0,4

Variáveis categóricas estão expressas como valor absoluto e percentuais. Variáveis contínuas expressas como médias, e intervalo de confiança de 95%.

*Atopia significa um ou mais testes de alergia cutânea (por punctura) positivo, com um halo 3 mm maior do que o controle negativo. Δ VEF₁ = variação de VEF₁. ** diferença da medida inicial, *** percentual do valor pré-broncodilatador. ****Ref⁽¹⁾ VEF₁ = Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo BD = broncodilatador CVL = Capacidade Vital Lenta VEF₁/CVL = Relação VEF₁/CVL após uso de broncodilatador. GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

A média e IC de 95% da contagem eosinófilos no sangue periférico, expressos em números absolutos $\times 10^9/L$ foi de 0,27(0,21–

0,33). A maioria dos participantes (59,5%) tinha uma contagem absoluta de eosinófilos no sangue $\geq 0,2 \times 10^9/L$, enquanto que em sete participantes (28,9%) esta contagem foi $\geq 0,4 \times 10^9/L$. Destes últimos, apenas três (42,9%) tinham eosinofilia no escarro.

Embora uma houvesse correlação positiva entre eosinofilia no escarro e no sangue periférico (Figura 3) a concordância entre estes dois parâmetros para diversos ponto de corte foi fraca (Tabela 6).

Figura 3 - Correlação entre eosinófilos no sangue periférico e no escarro induzido.

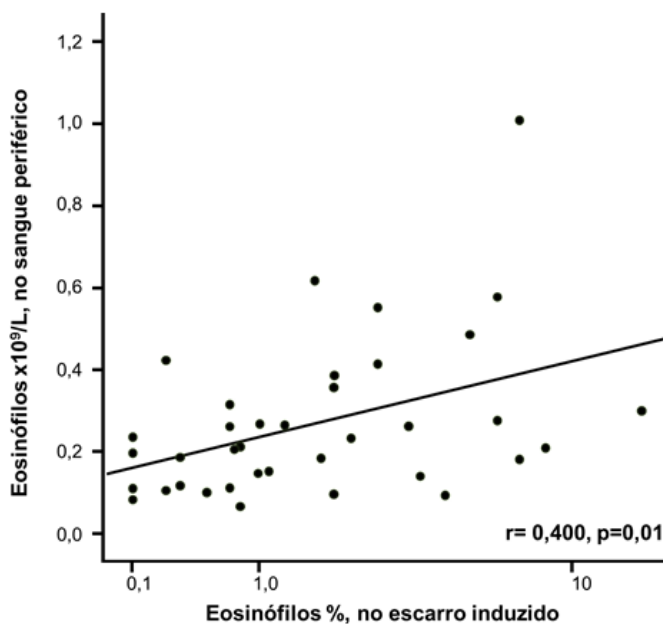


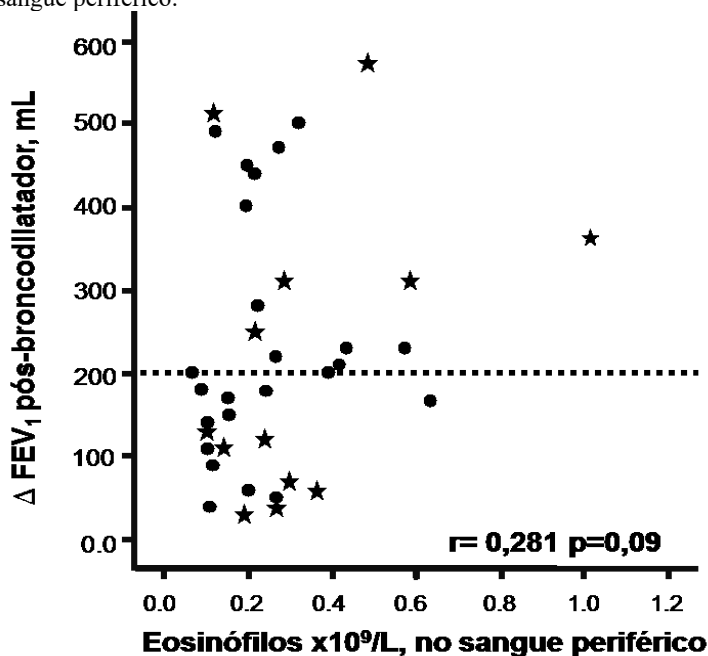
Tabela 6 - Concordância entre escarro eosinofílico e diversos pontos de corte de eosinófilos no sangue periférico

Eosinófilos no Sangue Periférico	<i>Kappa</i>	p
$\geq 0,20 \times 10^9/L$	0,130	0,3
$\geq 0,30 \times 10^9/L$	0,140	0,4
$\geq 0,40 \times 10^9/L$	0,07	0,6
$\geq 2,0 \%$	0,109	0,3
$\geq 3,0 \%$	0,137	0,4
$\geq 4,0 \%$	0,155	0,3

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE EOSINÓFILOS NO ESCARRO E NO SANGUE PERIFÉRICO COM RESPOSTA BRONCODILATADORA

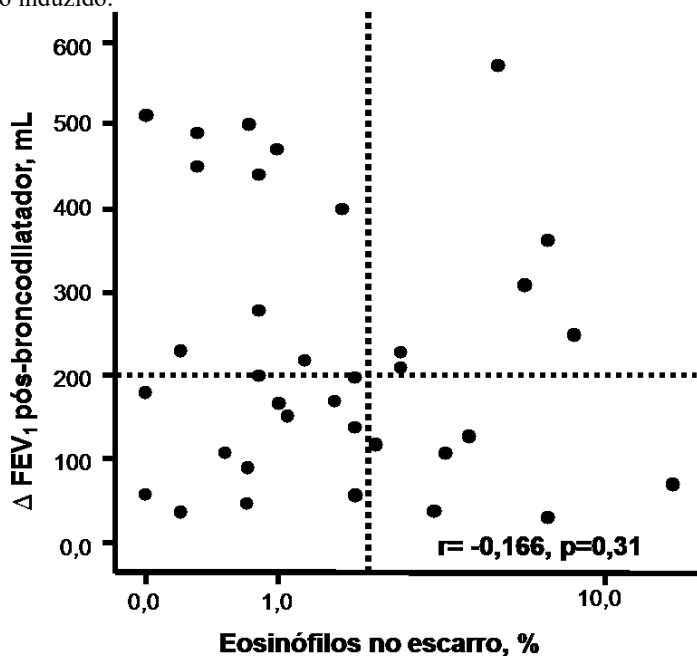
Não houve correlação significativa entre eosinófilos no sangue periférico ($\times 10^9/L$) e resposta broncodilatadora expressa em ml (Figura 4). Tampouco houve correlação entre inflamação eosinofílica nas vias aéreas (%) com resposta broncodilatadora (ml) como mostra a Figura 5.

Figura 4 - Correlação da variação do VEF1 pós-broncodilatador e eosinófilos no sangue periférico.



Círculos representam escarro não eosinofílico (eosinófilos $<3\%$). Estrelas representam escarro eosinofílico (eosinófilos $\geq 3\%$). A linha pontilhada horizontal representa aumento de 200 ml no VEF₁ pós-broncodilatador.

Figura 5 - Correlação da variação do VEF₁ pós-broncodilatador e eosinófilos no escarro induzido.



A linha pontilhada horizontal representa aumento de 200 ml no VEF₁ pós-broncodilatador. A linha pontilhada vertical representa eosinofilia no escarro de 3%.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo fornecem evidências de que, em pacientes portadores de DPOC moderado a muito grave ⁽¹⁾ em fase estável da doença não existe diferença entre as medidas do VEF₁ e CVL medidas aos 20 ou 45 minutos após a inalação de broncodilatador. Os resultados também mostram que a magnitude da resposta broncodilatadora não está associada à contagem de eosinófilos no escarro ou no sangue periférico. Isto é importante por demonstrar que a avaliação funcional e a medida da inflamação das vias aéreas, na DPOC, não são intercambiáveis.

No presente estudo optamos pela definição de resposta broncodilatadora significativa da ATS/ERS ⁽²³⁾. De acordo com esta definição, quase metade dos indivíduos estudados apresentaram resposta broncodilatadora. Esses resultados estão alinhados com os de Tashkin e col ⁽²⁹⁾, que estudaram a resposta broncodilatadora em 5756 pacientes com DPOC que fizeram espirometria basal e 90 minutos após receberem 400 mcg de salbutamol e 80 mcg de ipratrópio. Destes, 53,9% tiveram um aumento no VEF₁ ≥ 200 ml e $\geq 12\%$ do valor basal.

Por outro lado, nosso estudo difere dos demais por avaliar a magnitude da resposta broncodilatadora em dois tempos distintos após o uso de broncodilatador. Revisando a resposta broncodilatadora na DPOC, Calverley ⁽³⁵⁾ cita a associação da magnitude da resposta broncodilatadora em relação ao tempo da medida, assinalando a grande variabilidade encontrada nos diferentes estudos. Por exemplo, Pascoe e col ⁽⁶⁷⁾ estudaram a resposta broncodilatadora de acordo com os critérios da ATS/ERS ⁽²³⁾ em 56 pacientes que receberam aleatoriamente salbutamol 400 mcg ou ipratrópio 80 mcg e vice-versa. A resposta broncodilatadora foi avaliada antes e uma hora após a administração do broncodilatador em dois dias diferentes com intervalo de dez dias. Os autores relatam que 45% dos participantes tiveram resposta broncodilatadora positiva sendo que, em 79% da amostra não houve mudança no tipo de resposta ao broncodilatadora, nos diferentes dias do estudo.

A medida da resposta broncodilatadora na DPOC, sua definição, significado e relevância ainda são motivos de divergência ⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾. Isso se reflete na grande variabilidade entre os estudos incluindo tempo de avaliação pós-broncodilatador, dose, tipo de broncodilatador utilizado, modo de administração além das diferenças entre as populações em estudo ⁽³⁵⁾. O documento mais recente da GOLD ⁽¹⁾, sugere que embora a espirometria pós-broncodilatador seja necessária

para o diagnóstico e avaliação da resposta broncodilatadora, o grau de reversibilidade da limitação do fluxo de ar na DPOC não deve ser usado na avaliação da doença pois não aumenta seu diagnóstico, não ajuda a diferenciar DPOC de asma nem serve para prever a resposta ao tratamento. Isto contrasta com o documento da GOLD de 2016 ⁽⁷⁰⁾ no qual se sugeria que uma resposta broncodilatadora com um aumento de $\geq 12\%$ e ≥ 400 ml no VEF₁, fosse altamente indicativa de asma ou compatível com sobreposição de asma/DPOC.

Os resultados do presente estudo mostram que 20% dos indivíduos apresentou resposta broncodilatadora no VEF₁ $\geq 12\%$ e ≥ 400 ml do valor basal, sendo que destes, apenas dois tinham eosinofilia no escarro e um tinha atopia. Nenhum dos pacientes tinha história sugestiva de asma, uma vez que este era um critério de exclusão do estudo. Além disto, todos eram fumantes de ≥ 20 maços/ano, o que torna difícil a opção por diagnóstico de asma ou sobreposição asma/DPOC e, evidencia que esse tipo de resposta broncodilatadora é possível na DPOC em concordância com o entendimento mais recente da GOLD ⁽¹⁾. Seria interessante avaliar a replicação destes resultados em estudos maiores e com populações mais heterogêneas.

No presente estudo, inflamação eosinofílica das vias aéreas (bronquite eosinofílica) foi encontrada em 35,1%. Estudos anteriores ^(45,61,71) já haviam observado eosinofilia de escarro em cerca de 20% a 40% de portadores de DPOC com doença estável. Mais recentemente, Negewo e col ⁽⁵³⁾, avaliaram 141 indivíduos portadores de DPOC com doença estável, e destes 31,9% tinham eosinofilia no escarro. Em outro estudo recente, Schleich e col ⁽⁵¹⁾ relataram uma prevalência de 37% de eosinofilia no escarro dos 155 indivíduos portadores de DPOC estável incluídos no estudo. Em conjunto, estes estudos mostram a robustez e consistência do exame do escarro para avaliar a inflamação das vias aéreas em pacientes com DPOC.

Nossos resultados diferem dos estudos anteriores por termos observado que os indivíduos com eosinofilia no escarro apresentavam maior gravidade da limitação ao fluxo de ar. Diferenças nas populações destes estudos podem justificar nosso achado, uma vez que tanto Negewo e col ⁽⁵³⁾ quanto Schleich e col ⁽⁵¹⁾ avaliaram pacientes em uso de terapêutica broncodilatadora única ou associada e, em alguns casos, associada a corticoides inalatórios.

Os resultados deste estudo também mostraram a inexistência de associação entre magnitude da resposta broncodilatadora e eosinofilia no escarro induzido. Estes achados diferem dos achados recentes de Queiroz e col ⁽⁶⁰⁾ que encontraram uma associação positiva significativa,

embora fraca, entre resposta broncodilatadora em portadores de DPOC e eosinófilos no escarro. É possível que diferenças entre as populações estudadas possam explicar estas discrepâncias, uma vez que os participantes do presente estudo não se encontravam em uso tratamento para a doença. Outra explicação pode residir no método de processamento do escarro induzido utilizada nos dois estudos.

Nossos resultados também não mostraram correlação entre eosinófilos no sangue e resposta broncodilatadora. Um dos poucos estudos a examinar esta associação foi a recente publicação de Pascoe e col ⁽⁷²⁾. Estes autores não também não conseguiram demonstrar uma associação entre eosinófilos no sangue e resposta broncodilatadora ao avaliar os dados de dois estudos randomizados totalizando 3177 pacientes com DPOC.

Também são escassos os estudos investigando a relação entre eosinofilia no escarro induzido e medida de eosinófilos no sangue periférico em pacientes com DPOC ^(51,53). Entretanto, devido ao fato da eosinofilia no escarro induzido ser um marcador de resposta aos corticoides e da ocorrência de exacerbações, tanto na asma ⁽⁴³⁾ quanto na DPOC ^(45,59,61,71), e de que o exame do escarro induzido não é facilmente disponível na prática clínica, recentemente tem aumentado o interesse no estudo da medida de eosinófilos no sangue periférico como marcador de inflamação eosinofílica das vias aéreas na DPOC.

Neste sentido, Singh e col ⁽⁵²⁾, revisando dados do estudo ECLIPSE ⁽⁴¹⁾, encontraram medida de eosinófilos >2% persistente (em todas as visitas do estudo) no sangue de 37% de 1483 portadores de DPOC estudados ao longo de três anos, 13,6% apresentaram eosinófilos sanguíneos persistentemente <2% e 49% apresentaram variação deste parâmetro ao longo do tempo. São poucos os estudos especificamente concebidos para avaliar os pontos de corte que melhor reflitam a presença de eosinofilia nas vias aéreas em pacientes com DPOC estável.

Em pacientes estáveis Schleich e col ⁽⁵¹⁾ relatam valores de eosinófilos no sangue periférico de 2,6% ou $0,162 \times 10^9/L$ como os melhores pontos de corte para prever inflamação eosinofílica em vias aéreas. Em outro estudo recente Negewo e col ⁽⁵³⁾ mostraram que a presença de eosinófilos $\geq 0,2 \times 10^9/L$ possui sensibilidade de 91,1% e especificidade de 50% em prever inflamação eosinofílica de vias aéreas sugerindo que este parâmetro pode ser uma importante ferramenta na avaliação da eosinofilia das vias aéreas na DPOC. Usando o ponto de corte $\geq 0,2 \times 10^9/L$ no sangue periférico a maioria dos participantes (59,5%) do nosso estudo apresentava esta medida de

eosinófilos no sangue periférico. Este achado é similar ao já relatado em outros estudos ^(53, 58, 73).

Examinou-se a correlação entre eosinófilos no sangue periférico e no escarro induzido. A despeito da correlação moderada entre eosinofilia no escarro e no sangue periférico a concordância entre estes dois parâmetros foi fraca, independente do ponto de corte. A baixa concordância entre os dois parâmetros sugere que estes oferecem informações diferentes que podem ou não ser complementares. Isto é importante porque nossos resultados questionam o significado da presença de eosinófilos no sangue periférico, particularmente em relação à sua habilidade em prever exacerbações e benefício clínico com o uso de corticoides na DPOC, a exemplo do que ocorre com a eosinofilia no escarro induzido ^(45,74).

Neste contexto, dois estudos recentes ^(75,76) analisando eosinófilos no sangue, ao contrário de outros estudos igualmente bem desenhados e bem conduzidos ^(72,77) não foram capazes de definir um subgrupo de pacientes com DPOC que se beneficiaria do tratamento com corticoides. Entretanto, os eosinófilos no sangue parecem identificar quais exacerbações da DPOC se beneficiariam do tratamento com corticoide sistêmico ⁽⁷³⁾. Estas discrepâncias merecem ser investigadas.

O presente estudo tem como principal limitação o delineamento transversal que nos impossibilita avaliar a estabilidade da medida de eosinófilos no sangue de portadores de DPOC livres de tratamento com corticoides e examinar as implicações longitudinais de nossos achados. Poderia também se argumentar que a seleção dos pacientes, que resultou em uma amostra homogênea e bem caracterizada de pacientes com DPOC, sem o uso de corticoides inalatórios, limitasse a aplicabilidade dos presentes resultados. Apesar desta homogeneidade ser interpretada como um ponto forte do estudo, uma vez que permitiu responder às questões do estudo em pacientes que inquestionavelmente eram portadores da doença, entende-se que a generalizabilidade externa dos resultados é menor, necessitando ser investigada em outras populações.

Em síntese, os achados do presente estudo adicionam conhecimento sobre a resposta broncodilatadora na DPOC e sua relação com a inflamação eosinofílica nas vias aéreas e no sangue. Os resultados sugerem que, em pacientes portadores de DPOC, virgens de tratamento com corticóides, é indiferente medir a resposta broncodilatadora à inalação de 400 mcg de salbutamol aos 20 ou 45 minutos e que a presença ou magnitude desta resposta não está relacionada à inflamação eosinofílica medida tanto no sangue quanto no escarro induzido.

6 CONCLUSÕES

1. É indiferente medir a resposta broncodilatadora à inalação de 400 mcg de salbutamol aos 20 ou 45 minutos em pacientes com DPOC virgens de tratamento com corticoides e em fase estável da doença.
2. A resposta broncodilatadora na DPOC não está associada à inflamação eosinofílica medida no sangue ou no escarro induzido.
3. A concordância entre eosinofilia no escarro induzido e no sangue periférico, na amostra estudada foi baixa, independente do ponto de corte utilizado.

REFERÊNCIAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (Updated 2017) [online]. 2017; Available from: <http://goldcopd.org>. (accessed 10 april 2017).
2. World Health Organization. Global Burden of Disease Website. 2017. Available from: http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease (accessed 10 april 2017).
3. Nascimento OA, Camelier A, Rosa FW, Menezes AM, Pérez-Padilla R, Jardim JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease is underdiagnosed and undertreated in São Paulo (Brazil): results of the PLATINO study. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(7):887-95.
4. Moreira GL, Manzano BM, Gazzotti MR, Nascimento OA, Perez-Padilla R, Menezes AMB, Jardim JR. PLATINO, a nine-year follow-up study of COPD in the city of São Paulo, Brazil: the problem of underdiagnosis. *J Bras Pneumol.* 2013;40(1):30-37.
5. Tantucci C, Modina D. Lung function decline in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2012;7:95-9.
6. Pérez-Padilla R, Fernandez-Plata R, Montes de Oca M, Lopez-Varela MV, Jardim JR, Muiño A, Valdivia G, Menezes AMB; PLATINO group. Lung function decline in subjects with and without COPD in a population-based cohort in Latin-America. *PLoS One.* 0174;12(5): e0177032.
7. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(5):557-82.
8. Wheaton AG, Cunningham TJ, Ford ES, Croft JB. Employment and activity limitations among adults with chronic obstructive pulmonary disease—United States, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(11):289–295.
9. Ding B, Small M, Bergström G, Holmgren U. COPD symptom burden: impact on health care resource utilization, and work and activity impairment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017 Feb 21;12:677-689.
10. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The

nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350: 2645–2653, 2004.

11. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, Wright AC, Gefter WB, Litzky L, Coxson HO, Pare PD, Sin DD, Pierce RA, Woods JC, McWilliams AM, Mayo JR, Lam SC, Cooper JD, Hogg JC. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2011;365: 1567–1575.
12. Hogg JC, Paré PD, Hackett TL. the contribution of small airway obstruction to the pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Physiol Rev* 2017;97: 529–552
13. Lange P, Halpin DM, O'Donnell DE, MacNee W. Diagnosis, assessment, and phenotyping of COPD: beyond FEV₁. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11 Spec Iss:3-12.
14. Pellegrino R, Antonelli A, Mondino M. Bronchodilator testing: an endless story. *Eur Respir J*. 2010;35(5):952-4.
15. Hanania NA, Celli BR, Donohue JF, Martin UJ. Bronchodilator Reversibility in COPD. *CHEST*. 2011;140:1055–1063.
16. Calverley PM. The clinical usefulness of spirometric information. *Breathe* 2009; 5: 215-20.
17. Cooper CB, Dransfield M. Primary care of the patient with chronic obstructive pulmonary disease-part 4: understanding the clinical manifestations of a progressive disease. *Am J Med*. 2008;121(7 Suppl):S33-45.
18. Albert P, Agusti A, Edwards L, Tal-Singer R, Yates J, Bakke P, et al. Bronchodilator responsiveness as a phenotypic characteristic of established chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2012;67(8):701-8.
19. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319-38.
20. Scholes S, Moody A, Mindell JS. Estimating population prevalence of potential airflow obstruction using different spirometric criteria: a pooled cross-sectional analysis of persons aged 40–95 years in England and Wales. *BMJ Open* 2014; 4: e005685.
21. Hansen, James E.; Sun, Xing-Guo; Wasserman K. Spirometric Criteria for Airway Obstruction. *Chest*. 2007;131(2):349–55.
22. Tweedale PM, Alexander F, McHardy GJR. Short term variability in FEV₁ and bronchodilator responsiveness in patients with obstructive ventilatory defects. *Thorax* 1987; 42: 487 - 490.

23. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005;26(5):948-68.
24. Celli BR. The importance of spirometry in COPD and asthma: effect on approach to management. *Chest*. 2000;117(2 Suppl):15S-9S.
25. Anthonisen NR, Lindgren PG, Tashkin DP, Kanner RE, Scanlon PD, Connett JE, et al. Bronchodilator response in the lung health study over 11 yrs. *Eur Respir J*. 2005;26(1):45-51.
26. O'Donnell DE. Assessment of bronchodilator efficacy in symptomatic COPD: is spirometry useful? *Chest*. 2000;117(2 Suppl):42S-7S.
27. Kjeldgaard P, Dahl R, l kke A, Ulrik CS. Detection of COPD in a high-risk population: should the diagnostic work-up include bronchodilator reversibility testing? *International Journal of COPD* 2015;10 407–414.
28. Calverley PM, Burge PS, Spencer S, Anderson JA, Jones PW. Bronchodilator reversibility testing in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2003;58(8):659-64.
29. Tashkin DP, Celli B, Decramer M, Liu D, Burkhart D, Cassino C, et al. Bronchodilator responsiveness in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2008;31(4):742-50.
30. Silvestri IC, Pereira CAC, Rodrigues SC. Comparação da variação de resposta ao broncodilatador através da espirometria em portadores de asma ou doença pulmonar obstrutiva cr nica. *J Bras Pneumol*. 2008;34(9):675-682.
31. Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, Yates JC, Agusti A, Bakke P, et al. Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *N Engl J Med*. 2011;365(13):1184-92.
32. Han MK, Wise R, Mumford J, Sciurba F, Criner GJ, Curtis JL, et al. Prevalence and clinical correlates of bronchoreversibility in severe emphysema. *Eur Respir J*. 2010;35(5):1048-56.
33. Tan WC, Bourbeau J, Hernandez P, Chapman KR, Cowie R, FitzGerald JM, et al. Bronchodilator responsiveness and reported respiratory symptoms in an adult population. *PLoS One*. 2013;8(3):e58932.
34. Menezes AM, Pérez-Padilla R, Wehrmeister FC, Lopez-Varela MV, Mu o A, Valdivia G, et al. FEV1 is a better predictor of mortality than FVC: the PLATINO cohort study. *PLoS One*. 2014;9(10):e109732.

35. Calverley PM, Albert P, Albert PP. Broncodilator reversibility in chronic obstructive pulmonary disease: use and limitations. *Lancet* 2013; 1: 564-73.
36. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2009; 360:2445-2454.
37. Agusti A, MacNee W. The COPD control panel: towards personalised medicine in COPD. *Thorax*. 2013;68(7):687-90.
38. Sethi S, Mahler DA, Marcus P, Owen CA, Yawn B, Rennard S. Inflammation in COPD: implications for management. *Am J Med*. 2012;125(12):1162-70.
39. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004;364(9435):709-21.
40. Agusti A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One*. 2012;7(5):e37483.
41. Singh D, Edwards L, Tal-Singer R, Rennard S. Sputum neutrophils as a biomarker in COPD: findings from the ECLIPSE study. *Respir Res*. 2010;11:77.
42. Bartoli ML, Costa F, Malagrino L, Nieri D, Antonelli S, Decusatis G, et al. Sputum inflammatory cells in COPD patients classified according to GOLD 2011 guidelines. *Eur Respir J*. 2016;47(3):978-80.
43. George L, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis*. 2016;7(1):34-51.
44. Zanini A, Cherubino F, Zampogna E, Croce S, Pignatti P, Spanevello A. Bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation, and reversibility in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1155-61.
45. Leigh R, Pizzichini MM, Morris MM, Maltais F, Hargreave FE, Pizzichini E. Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment. *Eur Respir J*. 2006;27(5):964-71.
46. Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(5):598-604.
47. Calverley PM. Through a glass darkly: inhaled corticosteroids, airway inflammation and COPD. *Eur Respir J*. 2017;49(1).
48. Pizzichini MM, Popov TA, Efthimiadis A, Hussack P, Evans S, Pizzichini E, et al. Spontaneous and induced sputum to measure

- indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(4 Pt 1):866-9.
49. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*. 1996;9(6):1174-80.
 50. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(2 Pt 1):308-17.
 51. Schleich F, Corhay JL, Louis R. Blood eosinophil count to predict bronchial eosinophilic inflammation in COPD. *Eur Respir J*. 2016;47(5):1562-4.
 52. Singh D, Kolsum U, Brightling CE, Locantore N, Agusti A, Tal-Singer R, et al. Eosinophilic inflammation in COPD: prevalence and clinical characteristics. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1697-700.
 53. Negewo NA, McDonald VM, Baines KJ, Wark PA, Simpson JL, Jones PW, et al. Peripheral blood eosinophils: a surrogate marker for airway eosinophilia in stable COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:1495-504.
 54. Saha S, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2006;1(1):39-47.
 55. Miller J, Edwards LD, Agustí A, Bakke P, Calverley PM, Celli B, et al. Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Respir Med*. 2013;107(9):1376-84.
 56. Calverley PM, Tetzlaff K, Vogelmeier C, Fabbri LM, Magnussen H, Wouters EF, et al. Eosinophilia, Frequent Exacerbations, and Steroid Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017.
 57. Marín JM, Ciudad M, Moya V, Carrizo S, Bello S, Piras B, et al. Airflow reversibility and long-term outcomes in patients with COPD without comorbidities. *Respir Med*. 2014;108(8):1180-8.
 58. DiSantostefano RL, Hinds D, Le HV, Barnes NC. Relationship between blood eosinophils and clinical characteristics in a cross-sectional study of a US population-based COPD cohort. *Respir Med*. 2016;112:88-96.
 59. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(6):662-71.

60. Queiroz CF, Lemos AC, Bastos ML, Neves MC, Camelier AA, Carvalho NB, et al. Inflammatory and immunological profiles in patients with COPD: relationship with FEV1 reversibility. *J Bras Pneumol.* 2016;42(4):241-7.
61. Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum Eosinophilia Predicts Benefit from Prednisone in Smokers with Chronic Obstructive Bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1511-17.
62. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. *Am Rev Respir Dis.* 1981 Jun;123(6):659-64.
63. Gell PGH, Coombs RRA, Lachmann PJ. Clinical aspects of immunology. 3d ed. Oxford Philadelphia: Blackwell Scientific Publications; distributed by J. B. Lippincott; 1975.
64. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3 Pt 1):1172-4.
65. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1(8476):307-10.
66. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
67. Pascoe S, Wu W, Zhu CQ, Singh D. Bronchodilator reversibility in patients with COPD revisited: short-term reproducibility. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;11:2035-40.
68. Hansen JE, Porszasz J. Counterpoint: Is an increase in FEV₁ and/or FVC $\geq 12\%$ of control and ≥ 200 mL the best way to assess positive bronchodilator response? No. *Chest.* 2014;146(3):538-41.
69. Pellegrino R, Brusasco V. Point: Is an increase in FEV₁ and/or FVC $\geq 12\%$ of control and ≥ 200 mL the best way to assess positive bronchodilator response? Yes. *Chest.* 2014;146(3):536-7.
70. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (Updated 2016) [online]. 2016; Available from: <http://goldcopd.org>. (accessed 10 april 2017).
71. Brightling CE, Monteiro W, Ward R, et al. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2000;356(9240):1480-85

72. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes, NC, Pavord, ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *The Lancet Respiratory medicine*. 2015;3(6):435-42.
73. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Pancholi M, Venge P, et al. Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(1):48-55.
74. Siva R, Green RH, Brightling CE, Shelley M, Hargadon B, McKenna S, Monteiro W, Berry M, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Respir J*. 2007;29(5):906-13.
75. Watz H, Tetzlaff K, Wouters EF, Kirsten A, Magnussen H, Rodriguez-Roisin R, Vogelmeier C, Fabbri LM, Chanez P, Dahl R, et al. Blood eosinophil count and exacerbations in severe chronic obstructive pulmonary disease after withdrawal of inhaled corticosteroids: a post-hoc analysis of the WISDOM trial. *Lancet Respir Med* 2016;4:390–398.
76. Roche N, Chapman KR, Vogelmeier CF, Herth FJ, Thach C, Fogel R, Olsson P, Patalano F, Banerji D, Wedzicha JA. Blood eosinophils and response to maintenance chronic obstructive pulmonary disease treatment: data from the FLAME trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1189–1197.
77. Siddiqui SH, Guasconi A, Vestbo J, Jones P, Agustí A, Paggiaro P, Wedzicha JA, Singh D. Blood eosinophils: a biomarker of response to extrafine beclomethasone/formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192:523–525.

ANEXO

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEP) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (continua).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Título do Projeto: *Limitação moderada à grave ao fluxo de ar em fumantes: valor preditivo da eosinofilia no escarro para benefício com altas doses de budesonida inalada.*

Pesquisador principal: Márcia Margaret M. Pizzichini

PARECER

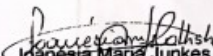
O projeto de pesquisa vem acompanhado de toda documentação exigida no protocolo.

Segundo nossa análise, consideramos o projeto aprovado. Porém, tratando-se de um experimento que será realizado em conjunto com pesquisadores e instituições estrangeiras e de acordo com o item VIII . 4 c.8 da Resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, sugerimos que o projeto seja encaminhado ao CONEP para apreciação.

Florianópolis 26 de agosto de 1998



Terezinha de Jesus Carvalho Neiva
Membra do Comitê de Ética em Pesquisa
com Seres Humanos



Janésia Maria Junkes Rothstein
Membra do Comitê de Ética em Pesquisa
com Seres Humanos

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEP) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (continua).



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N° 208/98

Processo n° 25000.009026976/98-11

Projeto de Pesquisa: *"Limitação Moderada à grave ao fluxo de ar em fumantes: valor preditivo da eosinofilia no escarro para benefício com altas doses de budesonide inalada"*

Pesquisador responsável: Márcia Margareth M. Pizzichini

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Ao se proceder a análise do processo acima, verificamos que foram atendidas as solicitações feitas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP que, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Brasília, 30 de outubro de 1998.

Assinatura manuscrita de William Saad Hossne.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

APÊNDICE

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
(continua).

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ confirmo que o Dr. _____ discutiu comigo a pesquisa intitulada “Limitação moderada à grave ao fluxo de ar em fumantes: valor preditivo da eosinofilia no escarro para benefício de tratamento com altas doses de budesonida inalada. Eu compreendi que:

1. A razão para fazer este estudo é melhorar nosso entendimento sobre a inflamação que ocorre nas vias respiratórias de pessoas que fumam e que já têm doença respiratória causada pelo cigarro, e também para saber se o tratamento com altas doses com corticosteroides inalados pode melhorar estes pacientes.
2. Eu serei visto pelos investigadores deste estudo no começo, durante e após meu tratamento.
3. O estudo consistirá de seis visitas num período de dois meses e meio. As **Visitas 1, 2, 4, 5 e 6** terão uma duração de mais ou menos duas horas cada. A **Visita 3** durará apenas trinta minutos.
4. Nas **Visitas 1, 2, 4, 5 e 6**, além de uma avaliação médica completa, várias outras medidas de pesquisa serão realizadas. Estas medidas são: um questionário completo e detalhado, testes respiratórios (espirometria), tossir para produzir catarro após inalar uma solução de água e sal por cerca de 20 minutos, retirada de 20 ml de sangue e caminhada durante 6 minutos. Além disto eu farei uma radiografia do pulmão e testes de alergia (se não houver sido realizado no último ano), na **Visita 2**. Na **Visita 3** eu simplesmente vou repetir o teste da caminhada em seis minutos.

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
(continuação).

5. Os riscos associados com estes procedimentos são mínimos. Eles incluem um leve aperto no peito, chio, ou falta de ar durante os testes respiratórios, durante a caminhada de 6 minutos ou durante a nebulização com a solução de água e sal para produzir catarro. Estes sintomas melhoraram espontaneamente ou dentro de minutos após o uso da bombinha com broncodilatador.

6. O tratamento usado neste estudo é frequentemente receitado para pacientes com doença pulmonar devido ao cigarro. Ele é um tratamento considerado seguro e se causar efeitos colaterais, estes serão mínimos. Espera-se que o tratamento seja bem tolerado. Possíveis efeitos colaterais podem incluir monilíase oral (sapinho) e rouquidão. O risco destes efeitos colaterais pode ser diminuído pelo ato de enxaguar a boca com água e cuspi-la após usar a medicação do estudo. A prednisona pode causar aumento do apetite, insônia, alterações do humor, manchas roxas na pele, acne, aumento do açúcar no sangue, e retenção de líquidos que desaparecem após a suspensão da prednisona. Se qualquer destes efeitos ocorrerem ou me preocuparem, eu entendo que posso telefonar para me aconselhar.

7. Eu poderei ou não me beneficiar com o tratamento usado no estudo.

8. Minha participação no estudo é voluntária e eu estou livre para me retirar do estudo em qualquer momento sem prejuízos para meu tratamento médico futuro.

10. Se eu tiver qualquer dúvidas ou preocupações eu poderei contatar com a Dra. Marcia MM Pizzichini ou com o Dr. Emilio Pizzichini telefonando para 224-5226 ou 971-8273.

11. Toda a informação obtida durante o estudo será confidencial.

12. Eu concordo em participar deste estudo.

Participante:

Data:

Testemunha:

Data:

Médico:

Data: